

Rapport de mission en Côte d'Ivoire  
20 août - 28 septembre 1990  
J.C PREVOT



*Institut de Recherches sur le Caoutchouc*

*Département du Centre de Coopération Internationale  
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)  
42, rue Scheffer 75116 Paris (France) - Tél. : (1) 47.04.32.15*

*Télex : 620871 INFRANCA PARIS*

**RAPPORT DE MISSION EN COTE D'IVOIRE**

**20 août - 28 septembre 1990**

**J.C. PREVOT**

## REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement Monsieur Y. BANCHI, Directeur du Centre de Bimbresso et Monsieur Z. KONE, Directeur Administratif et tous les chercheurs de l'IRCA Côte d'Ivoire pour le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer.

Je remercie très vivement MM. J. COMMERE, R. LACROTTE et E. SERRES pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'accomplissement de cette mission.

Que tout le personnel du laboratoire de physiologie soit également remercié pour le travail fourni durant mon séjour.

.\*  
\* \*

## SOMMAIRE

CALENDRIER DES ACTIVITES . . . . .	1
1. MATERIEL ET TECHNIQUES . . . . .	5
1.1. MATERIEL VEGETAL . . . . .	5
1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DEFINI . . . . .	6
1.2.1. Mesures des activités PPase et ATPase de la membrane lutoïdique . . . . .	7
1.2.2. Mesures de l'osmolarité . . . . .	9
1.2.3. Analyse des paramètres physiologiques . . . . .	9
2. RESULTATS . . . . .	9
2.1. ACTIVITES PPase ET ATPase DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE . . . . .	9
2.2. MESURES DE L'OSMOLARITE . . . . .	13
2.3. ANALYSE DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES . . . . .	15
2.3.1. Pour le clone PB 217 . . . . .	15
2.3.2. Pour le clone GT 1 . . . . .	20
2.3.3. Comparaison de la réponse à la stimulation chez les deux clones . . . . .	27

## CALENDRIER DES ACTIVITES

20 août	Arrivée à Abidjan.
21 août	Rencontre avec Y. Banchi (Direction), J. Keli (Phytotechnie), H. Legnate (Amélioration), A. Lemoine (Technologie). Repérage et marquage des arbres du clone GT 1, parcelle E2-NE.
22 août	Repérage et marquage des arbres du clone PB 217 parcelle B6-NE. Discussion avec R. Lacrotte et E. Serres des protocoles et des expériences de la mission.
23 août	Récolte de latex du clone PB 217. Essais de centrifugation. Préparation de matériel végétal. Essais de lavage des lutoïdes.
24 août	Récolte de latex du clone GT 1. Nouveaux essais de centrifugation. Préparation de matériel végétal.
25 août	Récolte de latex du clone GT 1. Température ambiante. Conservation dans de la glace.
27 août	Récolte de latex du clone PB 217 (1,2,3,4). Diagnostic latex. Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique. Préparation de matériel végétal.
28 août	Récolte de latex du clone GT 1 (5,6,7,8). Diagnostic latex. Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique. Préparation de matériel végétal.
29 août	Essais des activités PPase et ATPase. Mise au point de la méthode.
30 août	Récolte de latex du clone PB 217 (9,10,11,12). Diagnostic latex. Problème de centrifugeuse.
31 août	Essais de dosage de Pi en différents tampons. Courbes d'étalonnage du Pi. Etude des différentes méthodes de dosage du Pi et vérification du spectrophotomètre. Saignée du clone GT 1 en tasse, sans prélèvement.

- 3 septembre Récolte de latex du clone PB 217 (13,14,15,16).  
Diagnostic latex.  
Centrifugation du latex en tubes Eppendorf.
- 4 septembre Récolte de latex du clone GT 1 (17,18,19,20).  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Réception et mise en marche de l'Osmomat.
- 5 septembre Mesures de l'osmolarité des échantillons congelés.  
Mesures des activités PPase et ATPase.
- 6 septembre Récolte de latex du clone PB 217 (21,22,23,24).  
Diagnostic latex.  
Centrifugation du latex en tubes Eppendorf.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesures de l'osmolarité.
- 7 septembre Récolte de latex du clone GT 1 (25,26,27,28).  
Diagnostic latex.  
Centrifugation du latex en tubes Eppendorf.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesures de l'osmolarité.
- 8 septembre Récapitulation des résultats.  
Préparation des différentes solutions.
- 11 septembre Réception du matériel de laboratoire.  
Récolte de latex du clone PB 217 (29,30,31,32).  
Diagnostic latex.  
Centrifugation du latex en tubes Eppendorf.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesures de l'osmolarité.  
Visite de M. Marchal (Beckman) pour l'ultracentrifugeuse.
- 12 septembre Récolte de latex du clone GT 1 (33,34,35,36).  
Diagnostic latex.  
Centrifugation du latex en tubes Eppendorf.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase. Courbe étalonnage Pi.  
Mesures de l'osmolarité.
- 13 septembre Récolte de latex du clone PB 217 (37,38,39,40).  
Diagnostic latex.  
Ultracentrifugation. Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesure de l'osmolarité.

- 14 septembre Ultracentrifugeuse réparée.  
Réculte de latex du clone GT 1 (41,42,43,44).  
Diagnostic latex.  
Ultracentrifugation. Diagnostic sur cytosol et  
sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesure de l'osmolarité.
- 15 septembre Stimulation de 20 arbres du clone PB 217 (5 %  
sur encoche).  
Dosage des protéines après solubilisation des  
membranes.  
Récupération des différents coagulums pour CP.
- 17 septembre Réculte de latex du clone PB 217 (45,46,47,48).  
Modification du protocole expérimental de  
préparation cytosol-lutoïde.  
Diagnostic latex.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesure de l'osmolarité.
- 18 septembre Réculte de latex du clone GT 1 (49, 50, 51,  
52).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase.  
Mesure de l'osmolarité.
- 19 septembre Stimulation des séries 3 et 4 du clone GT 1  
(12 arbres) 5 % sur encoche.  
Dosage des protéines au bleu de Coomassie.  
Courbe d'étalonnage des protéines dans les  
conditions expérimentales.
- 20 septembre Réculte de latex du clone PB 217 (53, 54, 55,  
56).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase +  
protéines.  
Mesure de l'osmolarité.
- 21 septembre Réculte de latex du clone GT 1 (57, 58, 59,  
60).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase +  
protéines.  
Mesure de l'osmolarité.
- 22 septembre Récapitulation des résultats.  
Réculte des différents coagulums pour CP.

- 24 septembre Récolte de latex du clone PB 217 (61, 62, 63, 64).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase + protéines.  
Mesure de l'osmolarité.
- 25 septembre Récolte de latex du clone GT 1 (65, 66, 67, 68).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Dosage des activités PPase et ATPase + protéines.  
Mesure de l'osmolarité.
- 26 septembre Récapitulation des résultats.  
Etablissement des protocoles pour continuation des expériences.  
Discussion avec MM. Dian, Koffi, Serres et Lacrotte.
- 27 septembre Récolte de latex du clone PB 217 (69, 70, 71, 72).  
Diagnostic latex. Ultracentrifugation.  
Diagnostic sur cytosol et sérum lutoïdique.  
Fin de la mission.

\*  
\* \*

Le but de cette mission était principalement orienté autour de deux thèmes

Etude des activités de la pyrophosphatase et de l'ATPase lutoïdique dans différentes conditions.

Etude des compartiments lutoïdique et cytosolique (paramètres physiologiques, osmolarité).

En plus de ces thèmes, nous avons préparé du matériel végétal afin de poursuivre certaines études à Montpellier.

\*  
\* \*



## 1. MATERIEL ET TECHNIQUES

### 1.1. MATERIEL VEGETAL

Pour le clone PB 217 de 1977, nous avons sélectionné les arbres du bloc B6 NE en fonction de l'homogénéité de leur circonférence et de leur production. Quarante arbres ont été choisis, divisés en 4 lots de 10 arbres. Nous avons effectué 6 saignées avant la stimulation sur encoche (5 % Ethrel) et 5 saignées après celle-ci. Deux groupes d'arbres ont été stimulés, les deux autres étant conservés comme témoins.

Tableau 1 Valeur des circonférences et des productions des 4 groupes d'arbres sélectionnés du clone PB 217.

	Circonférence à 1,70 m	Production g/a/s
Arbres n°1 à 10	70.0 ± 3.8	49 ± 07
11 à 20	70.2 ± 5.0	49 ± 13
21 à 30	70.5 ± 4.7	46 ± 09
31 à 40	67.5 ± 4.7	44 ± 07

Les arbres 11 à 20 et 31 à 40 ont été stimulés.

Pour le clone GT 1 de 1981 de la parcelle E2 NE, 24 arbres ont été choisis pour leur circonférence homogène et répartis en 4 lots de 6 arbres suivant un gradient de production.

Tableau 2 Valeur des circonférences et des productions des 4 groupes d'arbres sélectionnés du clone GT 1.

Lot n°	Circonférence à 1,70 m	Production g/a/s
1	64.9 ± 2.6	40.8 ± 5.0
2	63.8 ± 2.2	30.6 ± 5.2
3	65.6 ± 5.0	27.3 ± 4.3
4	64.7 ± 3.8	21.5 ± 5.0

Une stimulation sur encoche a été appliquée après 6 saignées sur les lots 3 et 4 (5 % Ethrel). La fréquence de saignée pour tous les arbres était : d/3 6d/7.

## 1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DEFINI

Compte tenu de certains problèmes apparus lors des prélèvements de latex, puis au cours des centrifugations, nous avons été amenés à établir le protocole suivant, utilisé tout au long de la mission.

Le latex est récolté, dans des tubes secs et non glacés, entre la 5e et la 35e minute après la saignée. Malgré les inconvénients inhérents à des prélèvements à température ambiante, cette méthode a été retenue car les tubes entourés de glace contenaient souvent de l'eau de condensation. Il en résultait, des modifications du latex par déstabilisation des lutoïdes qui, après centrifugation, produisaient soit des "floculats", soit des microparticules de caoutchouc entraînées avec le culot et rendaient pratiquement impossible l'obtention de lutoïdes propres.

Quatre mélanges sont réalisés dans des flacons placés dans de la glace.

Chaque mélange correspond à 10 arbres pour le clone PB 217 (environ 35 ml/arbre) et à 6 arbres pour le clone GT 1 (environ 25 ml/arbre).

De retour au laboratoire, le latex est immédiatement centrifugé 30 minutes à 15 000 t/min (rotor 21).

Après récupération du cytosol total (y compris les fractions blanches) et élimination du caoutchouc, une aliquote du culot des lutoïdes est prélevée (3 g) sans lavage préalable, et immédiatement congelée. Le reste du culot est lavé 3 fois en présence de tampon TRIS-MES 50 mM + 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,50 contenant 0,33 M de mannitol. Après les lavages, les lutoïdes sont pesés et congelés puis lyophilisés.

Le cytosol est centrifugé une heure à 25 000 t/min (Rotor 30), une aliquote de sérum clair est prélevée pour dosage des paramètres physiologiques (sucres, RSH, Pi, Mg<sup>2+</sup>) et pour mesure de l'osmolarité, le reste est volumé, congelé et lyophilisé.

L'aliquote des lutoïdes congelés est placée en chambre froide le lendemain pour une décongélation douce, puis centrifugée une heure à 25 000 t/min pour obtenir le sérum lutoïdique sur lequel sont également effectués les dosages physiologiques et les mesures d'osmolarité.

#### 1.2.1. Mesures des activités PPase et ATPase de la membrane lutoïdique

Dans la continuité du travail de recherche effectué au laboratoire de Physiologie de Montpellier sur le métabolisme du pyrophosphate, et suite aux résultats acquis lors de la mission précédente sur la pyrophosphatase cytosolique, il était important d'effectuer des mesures d'activités sur du matériel non lyophilisé.

Etant donné les problèmes rencontrés avec l'ultracentrifugeuse, un protocole a été établi, que nous avons suivi tout au long de la mission. Le latex provenant des différents essais est réparti dans des tubes Eppendorf à raison de 1,5 ml de latex par tube et 3 tubes par mélange.

Après une centrifugation de 20 minutes, le cytosol et le caoutchouc sont éliminés. Les culots sont alors repris avec du tampon TRIS-MES 50 mM + 5 mM Mg Cl, pH 7,6 contenant 0,02 % de Triton X100, pottérisés puis centrifugés. Le surnageant, constitué principalement du contenu des lutoïdes, est éliminé.

Deux lavages successifs avec le même tampon, mais ne contenant pas de Triton sont effectués. Les culots sont enfin repris, toujours avec le même tampon mais contenant 100  $\mu$ M de molybdate de sodium afin d'inhiber les activités phosphatases résiduelles. Le volume final est de 7,5 ml.

#### *Incubation*

Pour chaque motif, deux fractions de 2,5 ml sont mis dans les tubes et placés dans un bain-marie à 30° C. Les incubations sont démarrées par l'addition de 50  $\mu$ l de pyrophosphate de sodium ou d'ATP à 50 mM (1 mM final).

Une aliquote de 750  $\mu$ l est prélevée aux temps 0, 20' et 40' pour les activités PPase et 0, 10 et 20' pour les activités ATPases.

Ces aliquotes sont placées dans des tubes Eppendorf contenant 500  $\mu$ l de TCA à 5 % + PCA 2 %.

Une centrifugation permet d'éliminer le culot des membranes et des protéines et le phosphore libéré par les réactions est dosé sur le surnageant.

#### *Dosage du Pi libéré*

- 750  $\mu$ l de surnageant sont placés dans des tubes à hémolyse et l'on ajoute 500  $\mu$ l de réactif composé de :
  - \* 2,5 ml de molybdate de Na à 10 % dans  $H_2SO_4$  10 N,
  - \* 22,5 ml d'eau,
  - \* 1,25 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ .
- la lecture est effectuée à 750 nm.
- une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant  $KH_2PO_4$  comme standard.

#### *Dosage des protéines*

Plusieurs essais de solubilisation des membranes ont été testés afin de pouvoir doser les protéines contenues dans le culot provenant de la précipitation acide des aliquotes des incubations. Les meilleurs résultats ont été obtenus en reprenant chaque culot par 50 ou 100  $\mu$ l de NaOH N contenant 1 % de Triton X 100.

Les dosages sont effectués en prélevant :

- 10  $\mu$ l de solution protéique,
- + 1,5 ml de solution NaCl à 9 %.
- + 1,5 ml de Bleu de Coomassie.<sup>1</sup>

La cuve témoin contient 3 ml de solution saline.

Les lectures se font à 620 et 465 nm.

---

<sup>1</sup>La solution de Bleu de Coomassie est préparée en dissolvant 0,06 % de Bleu de Coomassie G250 dans l'eau et en ajoutant 3 % d'acide perchlorique (4,3 ml de PCA à 70 % + 95,7 ml  $H_2O$ ). On lit à 465 nm contre de l'eau, la densité optique doit être comprise entre 1,3 et 1,5, rajouter du PCA à 3 % si besoin est.

Une courbe d'étalonnage est faite dans les mêmes conditions en utilisant de la Sérum albumine bovine.

### 1.2.2. Mesures de l'osmolarité

Au cours de la mission de 1987 (janvier-février), des essais préalables d'osmolarité avaient été effectués. Compte tenu des résultats acquis, il était intéressant de connaître par de nouvelles mesures les différences existantes entre le cytosol d'une part, et le sérum lutoïdique d'autre part.

Quelques problèmes techniques ne nous ont pas permis de réaliser, dans de strictes conditions, les mesures envisagées. En effet, l'ultracentrifugeuse étant tombée en panne durant 15 jours, certaines mesures ont été faites sur du cytosol et du sérum lutoïdique provenant de centrifugation à faible vitesse dans des tubes Eppendorf, d'autres, sur cytosol et sérum L ultracentrifugés.

Dans tous les cas, les mesures ont été effectuées sur 50  $\mu$ l de chaque essai. Une courbe d'étalonnage entre 0 et 0,5 M de NaCl était mesurée chaque jour.

### 1.2.3. Analyse des paramètres physiologiques

Pour le latex, le cytosol et le sérum lutoïdique, les paramètres classiques du diagnostic latex sont analysés sucres, thiols, phosphore, magnésium et pour le latex, l'extrait sec.

Ces analyses sont effectuées selon les techniques employées au laboratoire IRCA de Bimbresso.

## 2. RESULTATS

### 2.1. ACTIVITES PPase ET ATPase DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE

De nombreux problèmes sont apparus quant à la préparation des lutoïdes eux-mêmes. En effet, nous avons, au départ, prévu des lavages en tampon contenant de l'EDTA pour chelater le calcium libre et autres composés, susceptibles d'inhiber la réaction, et un protecteur de la dégradation des systèmes membranaires, le dithiothreitol (DTT) et du magnésium pour

maintenir l'intégrité du fonctionnement des enzymes étudiées. Il est apparu que l'EDTA, et plus encore le dithiothréitol, perturbaient le système de dosage interférant avec le réactif utilisé. Dans les conditions expérimentales et en présence de 1 mM de PPI, nous avons retenu les résultats suivants (tableau 3).

Tableau 3. Valeurs des DO trouvées pour le blanc en tampon additionné de différents effecteurs et en présence de 1 mM de PPI.

TAMPON	DO
Tris-MES 50 mM pH 7,50	0,112
Tris-MES 50 mM pH 7,50 + 5 mM Mg SO <sub>4</sub>	0,101
Tris-MES 50 mM pH 7,50 + 5 mM Mg SO <sub>4</sub> + 1 mM EDTA	0,374
Tris-MES 50 mM pH 7,50 + 5 mM Mg SO <sub>4</sub> + 1 mM EDTA + 5 mM DTT	1,480

Compte tenu de ces résultats, tous les lutoïdes ont été préparés en présence de tampon Tris-MES 50 mM + 5 mM Mg SO<sub>4</sub> à pH 7,50, additionné de Mannitol 0,33 M pour les lavages des lutoïdes qui seront congelés et lyophilisés.

Si, pour les activités PPases les valeurs trouvées étaient proportionnelles en fonction du temps entre 0 et 40', il n'en a pas été de même pour les activités ATPases. En effet, dans la plupart des cas, aucune proportionnalité n'apparaît entre 0 et 10' et 0 et 20'. Le rapport 0-10' étant souvent très largement supérieur au rapport 0-20'. La première hypothèse est l'action de certaines protéases, plus ou moins spécifiques, sur l'activité ATPase. Ces protéases auraient pour inhibiteur le fluorure Phényl-méthylsulfonyl (PMSF) (Marin, Eur. J. Biochem., 1985, 151, 131-140). Cette hypothèse est à vérifier, mais est peu probable compte-tenu du temps que représente la préparation des lutoïdes en partant du latex (centrifugations, lavages successifs, etc..) par rapport au temps que représente l'incubation en milieu réactionnel.

Une seconde hypothèse consiste à penser que l'activité ATPase, couplée au système pompe à protons, soit diminuée

lorsque l'équilibre de la pompe est atteint. Dans ce cas, on ne comprend pas pourquoi la PPase, dans la mesure où elle est aussi pompe à protons, continuerait de fonctionner de façon linéaire, et ce pour des valeurs de Pi libéré identiques.

La troisième hypothèse, plus vraisemblable, est de supposer que le système enzymatique est inhibé par le, ou les produits formés (ADP ou Pi) ou que ces derniers sont utilisés par un système de recyclage d'ATP (ATP synthase par exemple).

De même, une perte plus ou moins importante de culot membranaire est apparue lors des lavages des lutoïdes pour les mesures d'activité. Compte tenu que le dosage des protéines, après solubilisation des membranes, n'a pû être mis au point que tard dans la mission, seules, les activités potentielles des deux enzymes, et leur rapport seront pris en considération.

#### Pour le clone PB 217

Les activités potentielles PPases sont calculées en prenant la moyenne des rapports 0-20' et 20-40' d'incubation des deux mélanges des arbres témoins et des deux mélanges des arbres stimulés.

Les activités potentielles ATPases sont calculées en prenant seulement la valeur moyenne du rapport 0-10' d'incubation des deux mélanges des arbres témoins et des deux mélanges des arbres stimulés et exprimés en  $\mu\text{M}$  de Pi libéré par minute par ml de latex.

**Tableau 4.** Activités potentielles de la PPase et de l'ATPase dans 4 groupes d'arbres du clone PB 217 ; rapport ATPase/PPase des arbres témoins [R(T)] et des arbres stimulés [R(S)] ainsi que la différence R(S) - R(T).

1990	PPase			ATPase			R(T)	R(S)
	T	S	$\Delta$	T	S	$\Delta$		
13.09	17,5	16,5	-1,0	47,2	49,6	+2,4	2,70	3,01
17.09	14,3	6,2	-8,1	61,0	38,4	-22,6	4,27	6,19
20.09	13,6	14,9	+1,3	40,2	36,0	-4,2	2,96	2,42
24.09	8,5	9,2	+0,7	22,4	31,8	+9,4	2,63	3,46



Malgré les différences d'activités relevées d'une saignée à l'autre, nous observons les plus grandes différences, que ce soit pour la PPase ou l'ATPase, le 17.09.90, ce qui correspond à la première saignée après la stimulation. Dans les deux cas, ces différences sont négatives d'où une diminution des activités après la stimulation, résultats contraires à ceux obtenus par H. Chrestin (thèse).

De ce fait, les rapports d'activités qui se situent à 3, passent à 6 lors de cette journée, montrant ainsi que l'activité PPase est plus touchée que celle de l'ATPase.

Pour le clone GT 1

Les mêmes calculs sont effectués et les résultats exprimés également en  $\mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$  libéré par minute par ml de latex.

Tableau 5. Activités potentielles de la PPase et de l'ATPase des 4 groupes d'arbres du clone GT 1. ( $\mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$  libéré par minute par ml de latex).

M	PPase				ATPase			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Motifs								
18.09	5,8	5,3	5,3	3,9	17,8	15,1	12,6	13,2
21.09	9,4	5,1	5,5	5,8	44,7	9,8	40,5	39,5
25.09	16,0	14,6	16,6	13,7	51,3	48,7	45,5	38,1
Moyennes	10,4	8,3	9,1	7,8	37,9	24,5	32,9	30,3
R	ATPase PPase	1 = 3,64	2 = 2,95	3 = 3,61	4	3,88		

Il apparaît, à la lecture de ce tableau (si ce n'est une valeur faible pour l'activité ATPase le 21.09.90 pour le motif 2, qu'un gradient "descendant" d'activité apparaît des motifs 1 à 4. Les activités potentielles PPase et ATPase étant plus élevées pour les motifs à bonne production et inversement.

## CONCLUSIONS

Il semble difficile d'établir des relations que ce soit au vu de ces résultats, et, compte tenu des difficultés rencontrées (ou de la mise au point). Cependant, il est intéressant de poursuivre ces études, en dosant les protéines, afin d'établir des activités spécifiques pour



chaque clone d'une part, et en fonction de la stimulation d'autre part.

Il est à rappeler que, lors de cette mission, la mise au point des techniques, et la formation du personnel ont été les tâches essentielles.

## 2.2. MESURES DE L'OSMOLARITE

Lors de la mission 1987, des études préalables avaient été entreprises pour cette mesure, sur latex et sérum.

Pour évaluer les échanges transmembranaires au niveau des lutoïdes, il était intéressant d'avoir des valeurs concernant chaque compartiment : cytosol et sérum lutoïdique.

Compte tenu, d'une part, que l'osmomètre est arrivé au laboratoire le 05.09.90, et que les échantillons recueillis avant cette date avaient été congelés et décongelés pour mesures, causant des perturbations au sein du milieu (cristallographie), et que, d'autre part, du 30.08 au 14.09, l'ultracentrifugeuse était arrêtée pour un problème technique, les échantillons ont été préparés de façon hétérogène. Ceci peut expliquer la différence des valeurs obtenues en fonction du système de centrifugation employé.

Le protocole qui nous paraît devoir être utilisé est le suivant en premier lieu, une centrifugation du latex à 15 000 t/minute pour récupérer les lutoïdes tels quels et les congeler afin de faire éclater les membranes, en second lieu, une centrifugation du cytosol et de ces mêmes lutoïdes, après décongélation, durant 1 heure à 40 000 t/minute, afin d'obtenir, dans les deux cas, un sérum clair. Nous avons effectué, en moyenne, 4 mesures pour chaque échantillon analysé.

Pour le clone PB 217, les valeurs moyennes obtenues tous motifs confondus sur 6 saignées successives (exprimées en Osmol/kg) sont les suivantes :

.313 ± .010 pour le sérum cytoplasmique et  
.267 ± .036 pour le sérum lutoïdique

Il est à signaler une grande "variabilité" des valeurs pour le sérum lutoïdique, due sûrement à la préparation elle-même, compte tenu de ce qui a été signalé plus haut. Ces valeurs sont à la limite de la signification.

Pour le clone GT 1, les valeurs moyennes obtenues par motif sur 6 saignées successives sont reprises dans le tableau 6.

**Tableau 6. Valeurs moyennes de l'osmolarité de 6 saignées successives des 4 groupes d'arbres du clone GT 1 (valeurs exprimées en Osmol/Kg)**

Motifs	cytosol	sérum lutoïde
1	.334 $\pm$ .022	.284 $\pm$ .032
2	.343 $\pm$ .046	.291 $\pm$ .041
3	.328 $\pm$ .034	.297 $\pm$ .017
4	.325 $\pm$ .015	.289 $\pm$ .034
moyenne	.332 $\pm$ .032	.292 $\pm$ .032

Les mesures de la courbe d'étalonnage effectuées entre 0 et 0,5 M de NaCl ont donné pour 11 mesures (1 mesure par jour)

0.0M	.003 $\pm$ .001
0.1M	.181 $\pm$ .004
0.2M	.353 $\pm$ .005
0.3M	.559 $\pm$ .008
0.4M	.736 $\pm$ .007
0.5M	.937 $\pm$ .028

Compte tenu de la fiabilité des mesures, au niveau de la courbe d'étalonnage, nous pensons que les écarts enregistrés pour les différents sérums (abstraction faite de la préparation) sont réels.

Nous observons une osmolarité plus faible (-20 mosmoles) chez le clone PB 217 par rapport au clone GT 1, que ce soit dans le cytosol (0.313  $\pm$  10 contre 0.332  $\pm$  32) que dans le sérum lutoïdique (0.267 contre 0.290). Il est également à noter les valeurs plus faibles du sérum lutoïdique par rapport au cytosol avec -46 mosmol pour le clone PB 217 et -42 mosmol pour le clone GT 1. Ces différences ne sont probablement pas significatives.

Des études ultérieures sur les teneurs en éléments minéraux du latex surtout K', nous permettront, peut-être, de tirer des conclusions sur un des éléments principaux intervenant dans l'osmolarité et, par conséquent, sur les mécanismes qui la régulent.

### 2.3. ANALYSE DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES

Pour les différents paramètres, nous avons effectué les calculs des  $\Delta$  entre arbres stimulés et arbres témoins avant la stimulation et comparé aux mêmes  $\Delta$  après la stimulation.

#### 2.3.1. Pour le clone PB 217 (tableau 7)

Pour une meilleure exploitation des résultats, nous avons effectué la moyenne des 3 saignées avant la stimulation pour chaque paramètre et pour chacun des essais (arbres témoins et arbres stimulés).

#### La production

Elle voit sa valeur doubler pour les arbres stimulés dès la première saignée. Sur les 5 saignées après le traitement à l'Ethrel, l'augmentation est de +53 % par rapport aux arbres témoins. La valeur de la 5e saignée du motif stimulé tend à revenir à la normale (tableau 8).

Il est à souligner la faible réponse à la stimulation pour ce clone, mais l'écoulement était facile et la production relativement importante avant traitement (56 g/a/s).

#### L'extrait sec

Si les  $\Delta$  diminuent peu lors des 1e et 2e saignées après le traitement, une baisse supérieure à 4 points est observée lors des saignées suivantes. Elle correspond à plus de 10 % de la valeur de l'extrait sec des arbres témoins.

#### Le sucre

Dans le latex un effet sink est nettement visible lors de la 2e saignée, il s'observe aussi lors des 3e et 4e, comme

pour la production. La teneur en sucre retombe au niveau de celle des arbres témoins à la 5e saignée après la stimulation.

Dans le sérum cytoplasmique le même phénomène que dans le latex est mis en évidence, cependant, la valeur égale au témoin lors de la 2e saignée après le traitement est peut-être artéfactuelle ; toutefois les différences sont moins importantes que dans le latex.

Dans le sérum lutoïdique, il est étonnant de trouver autant de saccharose dans ce compartiment ; ces sérums dosés provenant d'une congélation de lutoïdes non lavés, afin de ne pas modifier les valeurs d'osmolarité, mesurées sur ces mêmes échantillons, peuvent être contaminés par du sérum C riche en sucres. Cependant, il faut souligner qu'il n'y a pas de relations particulières entre les concentrations en saccharose entre les sérums C et L des différentes saignées.

Les variations observées dans le sérum L sont irrégulières, le problème de la véritable teneur glucidique de ce compartiment se trouve posé.

### Le phosphore

Dans le latex, un gradient ascendant apparaît avec un  $\Delta$  de +0.2 seulement lors de la 2e saignée correspondant à l'optimum du saccharose, mais après le maximum de la production, alors que l'extrait sec ne diminuait pas encore. Il est possible que le  $P_i$  ait été utilisé pour régénérer l'énergie biochimique cellulaire et les synthèses phospholipidiques.

Dans le sérum cytoplasmique, il faut souligner la chute généralisée des valeurs trouvées. Elle est maximale lors des 2 premières saignées et étaye l'hypothèse précédente de l'utilisation du  $P_i$  pour renouveler le pool énergétique, et la synthèse des phospholipides membranaires. Les valeurs revenant presque à celles des témoins pour les 3 saignées suivantes.

**Tableau 7.** Valeurs des paramètres physiologiques pour le clone PB 217 dans le latex et ses différents compartiments au cours des saignées successives avant et après stimulation (1e et 3e motifs = témoins ; 2e et 4e = stimulés).

	ES	SUCRE			Pi			RSH			Mg		
		latex	st	sl	latex	st	sl	latex	st	sl	latex	st	sl
1	36.4	11.9	21.7	11.9	19.3	6.2	14.5	.67	1.13	.23	34.8	6.9	47.2
2	39.1	10.9	18.5	10.5	21.9	10.7	14.7	.67	1.14	.23	34.8	20.0	48.3
3	37.7	12.9	19.1	10.1	20.2	10.3	14.6	.64	1.12	.20	35.2	19.6	47.2
4	35.4	18.3	28.1	9.0	19.7	5.8	15.0	.67	1.10	.23	39.0	7.6	49.4
9	35.8	11.9			20.5			.71			33.1		
10	38.0	9.4			21.6			.69			29.4		
11	36.5	12.1			21.6			.71			33.5		
12	34.9	18.3			19.6			.71			35.2		
13	35.3	12.5	23.0		18.9	11.3		.64	0.97		20.8	10.6	
14	38.1	8.4	15.6		20.3	13.8		.64	1.05		21.9	11.7	
15	36.3	11.1	19.9		19.6	12.8		.63	1.04		21.5	11.3	
16	34.2	16.6	32.0		18.3	11.5		.64	1.08		26.6	12.4	
21	36.9	11.7	22.1	9.6	18.9	17.5	43.3	.69	.80	.34	28.0	16.5	63.7
22	39.2	7.4	17.0	8.0	18.6	16.7	49.0	.65	1.04	.38	24.7	16.1	65.7
23	37.0	10.3	19.5	8.2	19.5	13.0	49.4	.70	1.22	.42	25.1	15.2	65.7
24	35.1	16.0	32.6	12.3	16.7	14.9	40.7	.69	1.22	.48	27.6	16.9	66.1
29	35.4	12.3	30.8	9.2	18.4	12.4	46.3	.46	.94	.52	35.2	16.8	56.1
30	37.3	8.6	23.5	7.8	18.9	13.2	49.7	.41	.85	.70	32.5	16.0	54.7
31	37.0	10.6	24.3	8.8	18.2	11.5	52.0	.45	.86	.90	28.9	11.7	55.7
32	34.7	17.8	35.9	14.3	16.1	10.8	46.7	.51	.94	1.03	37.1	14.9	56.8
37	33.3	13.3	26.1	6.7	19.8	13.8	44.7	.69	1.53	.53	41.1	15.8	56.2
38	35.9	11.0	22.7	6.3	22.4	14.2	49.0	.69	1.44	.61	44.6	15.0	57.3
39	34.7	11.8	24.1	7.8	20.2	13.8	47.8	.63	1.36	.72	37.9	14.2	56.2
40	31.5	17.6	33.3	10.8	18.5	11.9	42.0	.69	1.44	.83	45.0	15.0	58.1
45	34.5	13.4	23.1	5.8	17.7	13.8	43.4	.70	1.70	.62	37.4	9.4	59.3
46	36.3	13.2	23.5	6.2	19.8	13.5	43.4	.55	1.40	.45	38.6	12.3	55.4
47	35.2	12.1	21.6	7.6	18.7	15.0	44.2	.64	1.60	.70	34.9	12.3	56.2
48	31.6	17.1	30.7	9.3	17.5	11.5	39.5	.60	1.39	.67	45.2	12.7	58.5
53	36.8	13.6	26.2	10.7	17.7	14.6	48.6	.69	1.58	.57	37.8	10.6	63.6
54	39.3	17.9	33.2	13.4	18.5	11.8	56.0	.55	1.38	.81	37.4	8.1	67.8
55	37.9	10.7	25.3	10.7	18.9	13.8	49.6	.61	1.56	.90	34.5	9.7	64.0
56	33.5	19.4	24.5	14.8	17.3	13.0	44.6	.62	1.51	1.07	37.4	9.3	65.3
61	37.7	11.8	23.8	11.8	19.7	10.5	53.9	.64	1.47	.79	43.7	11.4	58.2
62	35.7	13.2	26.7	11.8	22.7	10.5	52.0	.65	1.49	.82	50.1	11.0	57.4
63	38.6	9.9	24.4	12.6	19.5	10.9	53.9	.51	1.41	.99	32.2	11.8	58.2
64	30.8	18.2	33.7	16.4	19.3	9.7	48.1	.73	1.58	1.08	40.5	8.3	57.0
69	38.4	16.6	29.4	13.0	21.5	9.6	46.0	.67	1.45	.61	30.6	6.7	40.4
70	36.9	16.4	32.1	13.7	23.7	9.6	52.3	.68	1.58	.82	34.2	10.0	40.1
71	39.5	14.5	30.0	12.4	22.1	8.5	52.7	.57	1.45	.90	34.7	7.0	40.1
72	31.3	23.6	38.5	17.2	22.6	7.0	46.0	.80	1.62	.95	36.0	6.7	40.4
77	38.0	15.5	26.5	11.8	18.5	10.4	50.2	.63	1.51	.73	32.8	10.1	46.4
78	37.3	13.7	21.7	10.7	21.9	12.3	56.2	.68	1.62	.85	36.2	11.6	46.8
79	39.1	13.7	22.4	10.9	20.0	13.0	53.2	.62	1.49	.74	31.4	14.3	47.2
80	31.8	19.7	29.6	14.5	20.2	10.8	46.9	.77	1.74	.92	35.8	11.6	46.8



Tableau 8.  
Moyennes des paramètres obtenues des arbres témoins et stimulés du clone PB 217 (moyenne de 3 saignées avant et de chaque saignée après stimulation).

		Prod	ES	SUCRE			Pi			RSH			Mg <sub>1</sub> +		
		gas	%	latex	SC	SL	latex	SC	SL	latex	SC	SL	latex	SC	SL
moy. 3 S av.stim.  STIM.	T	56.9	35.7	11.7	24.5	8.4	19.2	13.5	47.3	.61	1.12	.57	32.7	15.1	58.9
	S	56.2	35.6	13.0	27.5	10.0	18.6	13.6	46.2	.61	1.16	.67	35.3	15.7	59.8
	T 17.09	45.2	34.9	12.8	22.4	6.7	18.2	14.4	43.8	.67	1.65	.66	36.2	10.9	57.8
	S	105.7	34.0	15.2	27.1	7.8	18.7	12.5	41.5	.57	1.40	.56	41.9	12.5	57.0
	T 20.09	56.8	37.4	12.2	25.8	10.7	18.3	14.2	49.1	.65	1.57	.74	36.2	10.2	63.8
	S	85.9	36.4	18.7	28.9	14.1	17.9	12.4	50.3	.59	1.45	.94	37.4	8.7	66.6
	T 24.09	47.6	38.2	10.9	24.1	12.2	19.6	10.7	53.9	.58	1.44	.89	38.0	11.6	58.2
	S	73.2	33.3	15.7	30.2	14.1	21.0	10.1	50.1	.69	1.54	.95	45.3	9.7	57.2
	T 27.09	62.8	39.0	15.6	29.7	12.7	21.8	9.1	49.4	.62	1.45	.76	32.7	6.9	40.3
	S	79.3	34.1	20.0	35.3	15.5	23.2	8.3	49.2	.74	1.60	.89	35.1	8.4	40.3
	T 01.10	49.3	38.6	14.6	24.5	11.4	19.3	11.7	51.7	.63	1.50	.74	32.1	12.2	46.8
	S	56.8	34.6	16.7	25.7	12.6	21.1	11.6	51.6	.73	1.68	.89	36.0	11.6	46.8
	[(Δ = stim. - tém.) ap. stim.] - [(Δ = stim - tém.) av. stim.]														
		+61.2	-0.8	+1.1	+1.7	-0.5	+1.1	-2.0	-1.2	-.10	-.19	-.20	+3.1	+1.0	-1.7
		+29.8	-0.9	+5.2	+0.1	+1.8	+0.2	-1.9	+2.3	-.06	-.16	+.10	-1.4	-2.1	+1.9
		+26.3	-4.8	+3.5	+3.1	+0.3	+1.7	-0.7	-2.7	+.11	+.06	-.04	+4.7	-2.5	-1.9
		+17.2	-4.8	+3.1	+2.6	+1.2	+1.7	-0.9	+0.9	+.12	+.11	+.03	-0.2	+0.9	-0.9
		+07.9	-3.9	+0.8	-1.8	-0.4	+2.4	-0.2	+1.0	+.10	+.14	+.05	+1.3	-1.2	-0.9

Dans le sérum lutoïdique, les fluctuations des valeurs trouvées avec une "séquestration" lors de la 2e saignée, sont peut-être le signe d'un pompage plus actif après stimulation. Il faut signaler, tous motifs confondus, que la teneur en Pi est 4 fois plus forte dans les lutoïdes que dans le cytosol.

#### Les thiols

Dans le latex, la chute des thiols immédiatement après stimulation est bien connue. Cette chute observée lors des deux saignées après le traitement, est suivie d'une augmentation sensible, signe d'une régénération active de ces protecteurs.

Dans le sérum cytoplasmique, le même profil que dans le latex apparaît logiquement. Il est identique à celui du Pi. Dans le sérum lutoïdique, excepté lors de la 1e saignée où une forte diminution apparaît, les valeurs trouvées par la suite sont proches de celles des arbres témoins et ce de celles trouvées dans le latex entier. Il est cependant étonnant d'obtenir de telles valeurs dans ce compartiment où l'on pensait qu'elles n'existaient pas. Il n'y a pas de relation avec les teneurs du sérum cytoplasmique ( $r = 0.52$  NS), le fait d'une "pollution" par ce dernier compartiment n'est pas exclu, mais pas non plus démontré. Il sera utile de préciser ce phénomène.

#### Le magnésium

Dans le latex, les résultats sont très variables et en conséquence on ne peut tirer aucune conclusion.

Dans le sérum cytoplasmique, des diminutions sensibles apparaissent lors des 2 et 3e saignées après la stimulation, avec des valeurs proches des témoins par la suite. un problème semble apparaître à la 4e saignée où les valeurs trouvées dans les deux cas sont faibles.

Dans le sérum lutoïdique, le profil du magnésium est très peu différent chez les arbres témoins et stimulés. Il faut remarquer dans ces expériences, que la concentration du magnésium au sein des lutoïdes atteint 5 fois celle du cytosol.

### 2.3.2. Pour le clone GT 1 (tableau 9)

Il faut rappeler que les études pour ce clone étaient axées sur des arbres à haute ou basse production. Une stimulation a été effectuée sur les arbres bas producteurs pour étudier leur réponse au traitement.

#### Avant la stimulation

Pour plus de compréhension des phénomènes, nous avons traité les résultats de la moyenne des 2 premiers motifs (HP) [ex. : n° 5 et 6] et des 2 derniers motifs (BP) [ex. : n° 7 et 8] des 6 saignées précédant la stimulation.

La production était respectivement de 35.7 et 24.4.

L'extrait sec, tout au long des 6 saignées mesurées, était supérieur pour les HP ( $41.5 \pm 0.4$  contre  $40.61 \pm 0.6$ ).

Pour les autres paramètres (tableau 10), le SC et le SL analysés correspondent aux 3 saignées précédant le traitement à l'Ethrel, saignées durant lesquelles les centrifugations ont permis d'isoler des lutoïdes en bon état.

#### Les sucres

	LATEX	SC	SL
HP	$12.8 \pm 1.7$	$25.3 \pm 2.1$	$11.2 \pm 1.9$
BP	$14.7 \pm 1.5$	$26.6 \pm 1.7$	$13.0 \pm 2.9$

Dans tous les cas, les valeurs de saccharose sont supérieures chez les arbres bas producteurs, signe d'un certain ralentissement de l'activité métabolique. Cependant, les valeurs trouvées sont normales pour ce clone.



## Le phosphore

	LATEX	SC	SL
HP	10.3 $\pm$ 1.3	8.1 $\pm$ 1.0	38.5 $\pm$ 5.9
BP	9.4 $\pm$ 1.3	8.2 $\pm$ 1.0	37.1 $\pm$ 7.0

Dans le latex la teneur en phosphore a tendance à être plus élevée chez les HP. Cependant, peu ou pas de différence, quels que soient les motifs ne sont mis en évidence dans les sérums C et L. Le rapport SL/SC est de 3.7 pour les HP et de 3.9 pour les BP.

## Les thiols

	LATEX	SC	SL
HP	0.70 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.14
BP	0.63 $\pm$ 0.06	1.45 $\pm$ 0.10	0.64 $\pm$ 0.18

Dans le latex et dans le sérum cytoplasmique, des valeurs plus élevées sont obtenues chez les arbres hauts producteurs. Même si ces valeurs ne sont pas significatives, elles sont systématiques sur les 6 saignées successives dans le latex et sur les 3 saignées successives pour le sérum cytoplasmique.

Ces résultats tendent à faire penser, comme pour le saccharose, à une activité métabolique plus faible chez les BP.

## Le magnésium

	LATEX	SC	SL
HP	15.0 $\pm$ 3.0	8.3 $\pm$ 1.7	51.3 $\pm$ 3.5
BP	11.6 $\pm$ 2.7	8.4 $\pm$ 1.3	42.2 $\pm$ 6.7

Que ce soit dans le latex ou dans le sérum lutoïdique, et bien que leurs différences ne soient pas significatives, les teneurs en magnésium sont plus élevées chez les HP. Pas de différence dans le sérum cytoplasmique.

**Tableau 9.** Valeurs des paramètres physiologiques pour le clone GT 1 dans le latex et ses différents compartiments au cours des saignées successives avant et après stimulation (1e et 2e motifs et HP = témoins ; 3e et 4e = stimulés et BP). La ligne noire indique la stimulation.

	ES	SUCRE			Pi			RSH			Mg		
		latex	§§	§l	latex	§§	§l	latex	§§	§l	latex	§§	§l
5	42.1	8.2	14.9	10.1	10.9	8.3	16.0	.70	1.11	.38	14.4	7.3	47.2
6	42.2	12.5	22.5	12.9	11.6	7.4	17.0	.71	1.11	.41	10.0	5.4	47.2
7	41.8	11.5	20.1	11.9	10.9	6.6	16.8	.65	1.09	.37	9.2	7.6	43.9
8	40.9	14.7	23.9	14.9	10.3	6.2	17.2	.64	1.06	.40	12.8	4.7	40.7
17	41.8	15.6	23.0		11.6	7.6		.77	1.07		19.8	8.4	
18	40.9	16.8	24.8		12.5	9.0		.78	1.12		19.0	10.2	
19	40.4	11.5	24.8		9.2	10.0		.59	1.12		16.1	13.2	
20	40.0	19.5	27.7		11.2	9.8		.74	1.05		13.2	9.9	
25	41.7	13.5	21.3	7.6	10.2	7.5		.75	1.56		15.0	6.1	57.1
26	41.2	13.3	24.2	8.2	10.2	7.2		.69	1.47		10.9	7.3	52.4
27	40.9	10.5	23.6	10.0	9.0	9.0		.60	1.39		10.1	10.1	52.0
28	41.0	8.8	22.1	11.2	7.7	10.6		.50	1.55		5.7	6.9	55.1
33	41.2	14.7	27.2	12.9	7.8	6.5	44.1	.65	1.46	.72	15.3	7.1	54.5
34	41.6	12.5	25.3	10.2	9.2	6.9	47.0	.66	1.49	.63	12.4	6.7	53.3
35	39.9	16.5	28.2	15.9	7.3	6.5	45.6	.65	1.41	.74	9.9	7.1	52.5
36	40.5	14.7	25.3	16.1	9.0	8.0	47.8	.64	1.39	.77	11.0	6.7	49.4
41	41.6	14.7	28.4	14.1	8.7	8.6	28.5	.68	1.64	.78	14.7	10.5	53.9
42	41.5	13.5	25.1	11.8	10.9	8.6	37.3	.67	1.65	.78	17.0	10.9	49.3
43	40.1	16.5	29.4	14.7	7.6	7.4	30.3	.63	1.56	.73	12.1	8.4	42.6
44	40.7	14.5	26.5	13.1	10.9	9.7	34.2	.65	1.61	.83	11.7	10.5	35.1
49	41.3	10.7	23.5	8.9	9.1	9.3	36.4	.66	1.56	.44	18.7	7.0	52.2
50	41.1	10.5	22.2	9.1	10.5	8.9	37.5	.68	1.52	.45	16.4	7.8	44.5
51	39.8	12.8	24.3	8.2	10.3	8.5	31.8	.71	1.42	.36	16.0	8.2	36.0
52	41.5	13.0	25.8	10.1	9.1	8.9	32.5	.61	1.31	.43	11.7	9.4	37.3
57	42.3	14.8	22.1	7.0	9.8	9.5	25.6	.73	1.50	.47	24.2	11.5	50.6
58	42.0	11.5	19.5	8.9	11.8	11.1	35.1	.68	1.49	.49	20.4	16.1	57.0
59	38.7	12.2	18.8	9.3	6.6	7.3	29.8	.46	.94	.50	12.7	12.4	51.1
60	40.5	11.1	15.1	7.0	9.6	6.9	29.8	.44	.84	.51	12.7	13.4	41.4
65	41.4	15.3	29.2	9.9	8.5	8.0	29.1	.68	1.51	.47	19.3	9.4	29.8
66	41.5	10.4	25.2	11.4	9.9	9.6	37.9	.60	1.48	.50	15.3	10.6	35.5
67	34.2	17.4	28.1	7.7	10.5	6.1	19.2	.58	1.15	.42	11.8	5.3	17.1
68	35.3	25.3	36.6	9.3	9.3	5.4	17.6	.48	.97	.46	10.6	4.9	14.3
73	41.7	14.5	25.1	14.5	8.7	7.5	41.9	.69	1.52	.61	15.8	8.9	45.8
74	41.5	12.8	24.1	12.8	10.9	8.6	47.1	.70	1.59	.57	13.1	12.9	46.1
75	34.3	12.8	18.9	11.6	11.5	7.7	46.1	.78	1.57	.53	9.1	7.7	40.6
76	35.9	16.6	24.8	15.3	11.5	6.4	47.9	.68	1.40	.60	9.7	5.9	37.3
81	47.1	16.8	27.5	16.4	8.2	5.9	39.4	.71	1.62	.64	19.4	9.0	45.2
82	41.4	14.7	24.8	14.3	11.2	7.0	44.6	.72	1.63	.60	18.6	12.1	44.5
83	34.8	15.5	23.4	11.3	12.6	6.3	47.9	.85	1.79	.67	15.5	8.2	42.1
84	35.9	16.0	25.1	12.6	14.3	5.5	53.8	.81	1.76	.78	13.5	7.0	40.6

Il semblerait que, chez les BP, non seulement le magnésium pénètre moins dans les laticifères, mais qu'il soit également moins absorbé par les lutoïdes, montrant ainsi une activité plus faible des pompes transmembranaires.

Le rapport SL/SC sont de 3.3 pour les HP et de 3.6 pour les BP, guère différent des valeurs trouvées pour le Pi.

#### Après la stimulation (tableau 10)

##### La production

Elle augmente lors des 4 saignées après le traitement à l'éthylène (+151 %).

##### L'extrait sec

Il diminue nettement à partir de la 2e saignée après la stimulation et se maintient durant les 2 saignées suivantes. Sur l'ensemble des 4 saignées, les valeurs moyennes obtenues pour les arbres témoins est de 42.4 % contre 36.2 % pour l'autre motif. La diminution est plus rapide que pour le clone PB 217.

##### Les sucres

Dans le latex et le sérum cytoplasmique, après une diminution lors de la 1e saignée, un effet sink est nettement visible à la 2e, et les valeurs reviennent rapidement au niveau de celles des arbres témoins.

Dans le sérum lutoïdique une diminution de la teneur en sucres s'observe tout au long de l'expérience.

##### Le phosphore

Dans le latex une diminution de la teneur en Pi, comme pour celle du saccharose, s'observe lors de la 1e saignée après stimulation, par la suite cette teneur remonte pour atteindre des valeurs supérieures à celles des témoins lors des deux dernières saignées.

Dans le sérum cytoplasmique, une forte diminution s'exprime lors des deux premières saignées, signe d'une utilisation intense de ce composé, avec un retour à des valeurs "normales" par la suite.

Dans le sérum lutoïdique, si les valeurs trouvées ne bougent pas lors de la 1<sup>re</sup> saignée après stimulation, malgré les diminutions dans le latex et le sérum cytoplasmique, une chute importante (près de 15 mM) s'observe à la 2<sup>e</sup> saignée (où l'extrait sec diminue fortement et où l'effet sink apparaît), puis les valeurs remontent au-dessus des témoins (phénomène identique, mais plus accentué que dans le latex), pouvant signifier une activation du processus de "pompage" de ces organites.

#### Les thiols

Dans le latex et dans le sérum cytoplasmique les mêmes variations apparaissent avec une forte diminution dès la 1<sup>re</sup> saignée après la stimulation et une néosynthèse en fin d'expérience.

Dans le sérum lutoïdique, il y a peu ou pas de variation.

#### Le magnésium

Dans le latex, une forte diminution apparaît (-6 mM) lors de la 1<sup>re</sup> saignée après stimulation avec un retour progressif vers les valeurs du témoin lors des saignées suivantes.

Dans le sérum cytoplasmique, si une légère diminution est visible lors de la 1<sup>re</sup> saignée après traitement, celle-ci est beaucoup plus importante par la suite, phénomène qui peut être, en partie, lié à la chute de l'extrait sec.

Dans le sérum lutoïdique, une chute importante apparaît (-8 mM) lors de la 2<sup>e</sup> saignée, puis les valeurs se retrouvent légèrement supérieures aux valeurs des arbres témoins.

Tableau 10.

Moyennes des paramètres obtenues des arbres témoins et stimulés du clone GT 1 (moyenne de 3 saignées avant et de chaque saignée après stimulation).

		Prod	ES	SUCRE			Pi			RSH			Mg <sub>1</sub> +		
		gas	%	latex	SC	SL	latex	SC	SL	latex	SC	SL	latex	SC	SL
moy. 3 S av.stim.  STIM.	T	39.9	41.4	12.8	25.3	11.2	9.4	8.1	38.5	.67	1.57	.64	15.8	8.3	51.3
	S	26.9	40.8	14.7	26.6	13.0	9.1	8.2	37.1	.65	1.45	.62	12.1	8.4	42.2
	T	41.4	42.2	13.2	20.8	8.0	10.8	10.3	30.4	.71	1.50	.48	22.3	13.8	53.8
	21.09 S	96.4	39.6	11.7	17.0	8.2	8.1	7.1	29.8	.45	.89	.51	12.7	12.9	46.3
	T	40.1	41.5	12.9	27.2	10.7	9.2	8.8	33.5	.64	1.50	.49	17.3	10.0	32.7
	25.09 S	82.3	34.8	21.4	32.4	8.5	9.9	5.8	18.4	.53	1.06	.44	11.2	5.1	15.7
	T	43.5	41.6	13.7	24.6	13.7	9.8	8.1	44.5	.70	1.56	.59	14.5	10.9	46.0
	28.09 S	54.1	35.1	14.7	21.9	13.5	11.5	7.1	47.0	.73	1.49	.57	9.4	6.8	39.0
	T	51.8	44.3	15.8	26.2	15.4	9.7	6.5	42.0	.72	1.63	.62	19.0	10.6	44.9
	02.10 S	40.5	35.4	15.8	24.3	12.0	13.5	5.9	50.9	.83	1.78	.72	14.5	7.6	41.4
	[(A = stim. - tém.) ap. stim.] - [(A = stim - tém.) av. stim.]														
		+68.0	-2.0	-3.4	-5.1	-1.6	-2.4	-3.3	+0.8	-.24	-.49	+.05	-5.9	-1.0	+1.6
		+55.2	-6.1	+6.6	+3.9	-4.0	-0.4	-3.1	-13.7	-.09	-.32	-.03	-2.4	-5.0	-7.9
		+23.6	-5.9	-0.9	-4.0	-2.0	+2.0	-1.1	+3.9	+.05	+.05	0	-1.4	-4.2	+2.1
		+01.7	-8.3	-1.9	-3.2	-5.2	+4.1	-0.7	+10.3	+.13	+.27	+.12	-0.8	-3.1	+5.6

En conclusion, dans le latex de ce clone GT 1, nous obtenons une diminution de tous les paramètres lors de la saignée après la stimulation alors que, malgré l'augmentation de la production, l'extrait sec varie peu.

Il est possible que l'activité métabolique intense pour maintenir l'ES à son niveau, malgré l'augmentation de la quantité exportée, se concrétise par une utilisation plus rapide des sucres, source initiale de la synthèse du caoutchouc et de la production d'énergie métabolique, avec en conséquence, une diminution du Pi servant au processus anabolique impliqué dans les transferts transmembranaires, qu'ils soient plasmalemmiques ou lutoïdiques.

Cette activité métabolique intense s'accompagne d'une surproduction d'oxygène toxique qui, pour être piégée, nécessite des thiols qui sont alors fortement utilisés avant qu'une néosynthèse de ces molécules ne se manifeste.

Quant à la chute observée du magnésium, aucune hypothèse sûre ne peut être avancée dans l'état actuel de nos connaissances.

Au cours de la 2e saignée après le traitement, un certain nombre de phénomènes se concrétisent l'augmentation nettement significative du saccharose, concomitante avec la chute de l'extrait sec montre que les transports de sucres et les transferts hydriques sont fortement activés ; le maintien à un faible niveau du Pi cytosolique peut s'expliquer par une surutilisation dans les processus métaboliques.

Tous ces phénomènes se maintiennent pour permettre une meilleure production.

Dans cette expérience, il apparaît que les arbres à production plus faible, n'étaient en fait que des arbres au repos dont il fallait seulement activer les mécanismes de fonctionnement, et non des arbres à problèmes, pour quelques raisons que ce soit.



### 2.3.3. Comparaison de la réponse à la stimulation chez les deux clones

#### La production

Une bonne réponse s'observe dans les deux cas avec en moyenne sur les 4 saignées après le traitement, +34 % pour le PB 217 et +37 % pour le GT 1.

#### L'extrait sec

Dans les deux cas, nous notons une diminution de ce paramètre avec, cependant, des valeurs moyennes plus faibles chez le clone GT 1 (-5.6 % sur 4 saignées) que chez le clone PB 217 (-2.8 %). Le phénomène s'exprime plus vite chez ce dernier clone.

#### Les sucres

Si chez le PB 217, une augmentation du saccharose dans le latex est générale tout au long de l'expérience (de même que dans le sérum cytoplasmique), pour le GT 1 nous observons d'abord une diminution lors de la 1<sup>re</sup> saignée après la stimulation avec un effet sink ponctuel à la 2<sup>e</sup> saignée, signe d'un métabolisme plus actif avec des réactions moins rémanentes.

#### Le phosphore

Dans le latex, nous obtenons une augmentation par rapport aux témoins quasi générale pour le clone PB 217, alors qu'il y a d'abord une diminution de valeur chez le GT 1 précédant une augmentation sensible.

Signe, là encore, d'un métabolisme plus actif chez le GT 1 avec une utilisation plus importante immédiatement après la stimulation.

Dans le sérum cytoplasmique, dans les deux cas, nous observons un même phénomène de diminution importante du  $P_i$  lors des 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> saignées après le traitement avec cependant des valeurs respectives de -3.3 mM et -3.1 mM pour le GT 1 et -2.0 et -1.9 pour le PB 217 et, compte tenu

des valeurs obtenues, une chute en pourcentage plus importante encore chez le premier. L'augmentation dans le sérum L peut indiquer un phénomène de "pompage" activé du cation.

#### Les RSH

Ici les variations obtenues sont parfaitement concordantes dans le latex et dans le SC, avec une diminution lors des 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> saignées après l'application de l'Ethrel et, par la suite une augmentation des composés réducteurs.

Les diminutions atteignent -0.1 mM et -0.19 mM dans le latex et dans le SC chez le PB 217 et -0.24 mM et -0.49 mM chez le clone GT 1.

#### Le magnésium

Il a une tendance quasi générale à suivre les profils du phosphore et ce dans quelque compartiment que ce soit, et chez les deux clones.

Globalement la stimulation tend à diminuer sa teneur, ce phénomène bien connu reste difficile à expliquer.

Il faut rappeler ici encore, que ces valeurs ont été obtenues, surtout pour le sérum L, avec des lutoïdes non lavés au préalable et qu'il est possible qu'une certaine "pollution" par le sérum cytoplasmique interfère. Cependant, aucune corrélation n'apparaît entre les deux compartiments, montrant ainsi que, même si une certaine quantité de sérum cytoplasmique est contenue dans le sérum lutoïdique, cela ne joue que faiblement sur les valeurs trouvées.

Il reste cependant à éclaircir le problème de la quantité de sucres et surtout de thiols trouvés dans le compartiment lutoïdique. Des expériences dans ce sens devront être poursuivies.